Journal of Water and Soil
https://jsw.um.ac.ir

Research Article
Vol. 39, No. 1, Mar.-Apr. 2025, p. 35-53

Enhancing Phosphorus Availability and Altering Soil Biochemical Responses Through Application of Humic Acid and *Streptomyces* Inoculation

N. Khalili [1], R. Ghorbani Nasrabadi [1*], M. Barani Motlagh [1], R. Khodadadi [1]

1- Department of Soil Science and Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
(*- Corresponding Author Email: rgnasr@yahoo.com)

Received: 13-10-2024 Revised: 15-03-2025 Accepted: 26-03-2025 Available Online: 26-03-2025	**How to cite this article:** Khalili, N., Ghorbani Nasrabadi, R., Barani Motlagh, M., & Khodadadi, R. (2025). Enhancing phosphorus availability and altering soil biochemical responses through humic acid application and *Streptomyces* inoculation. *Journal of Water and Soil, 39*(1), 35-53. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jsw.2025.90227.1442	

Introduction

Actinobacteria are one of the most abundant microbial groups in soil and play a crucial role in preserving ecosystems. They are among the soil microbial groups capable of releasing phosphorus from low-soluble or insoluble phosphorus sources, which enhances plant growth. Their application in agricultural systems is recognized as an environmentally friendly strategy to limit the negative effects of chemical inputs and improve the availability of nutrients, especially phosphorus, in the rhizosphere. Additionally, humic acid, as an organic growth stimulant, plays an important role in improving soil fertility and biological communities, and its combined use with actinobacteria increases the efficiency of fertilizer use, particularly phosphorus-based fertilizers. Therefore, the aim of this research was: (i) to screen the phosphorus solubilization potential of actinobacteria isolates at different incubation times, (ii) to investigate the effect of adding humic acid on the phosphorus solubilization capacity actinobacteria isolates under laboratory conditions, and (iii) to monitor the impact of selected actinobacteriun isolate and humic acid, at various phosphorus fertilizer levels, on soil phosphorus content, plant phosphorus uptake, and some biochemical properties of the soil.

Materials and Methods

In this study, five actinobacteria isolates, collected and purified from various agricultural, orchard, and rangeland ecosystems of Golestan Province, were screened based on their morphological characteristics. These strains were utilized for screening purposes. To prepare fresh cultures of the actinobacteria isolates, they were subcultured on solid yeast extract-malt extract agar medium. The effects of incubation time and the application of humic acid on the phosphate solubilization ability of the actinobacteria isolates were then investigated. This experiment was conducted in a factorial arrangement within a completely randomized design, with the following factors. To examine the effect of the selected superior actinobacterium isolate and its interaction with different phosphorus levels and humic acid application, a factorial pot experiment was conducted in a completely randomized design. The experimental factors included a mineral phosphorus source at three levels (control, 20 kg, and 40 kg of phosphorus per hectare from monoammonium phosphate), Streptomyces inoculation at two levels (control and inoculation with the selected isolate), and humic acid application at two levels (control and 2 mg per kg). The experiment was carried out on maize (Single Cross 704) with three replications. For seed preparation, a sufficient number of healthy maize seeds were selected and surface sterilized by immersing them in alcohol for 30 seconds. They were then exposed to 5%



https://doi.org/10.22067/jsw.2025.90227.1442

sodium hypochlorite for 2 to 3 minutes, followed by rinsing eight times with sterile distilled water. To prepare the microbial inoculum, the selected superior isolate was grown in yeast extract-malt extract medium at an appropriate (107 CFU/mL). The seeds were then placed in pots, and one milliliter of the Streptomyces suspension was applied to the seeds for inoculation. At the end of the experiment, the phosphorus content in the soil and plant, as well as the soil biochemical responses were measured.

Results

Based on the results obtained from this study, the application of humic acid led to an increase in microbial biomass and enhanced phosphorus release by actinobacteria isolates under laboratory conditions. As the incubation period extended from 7 to 14 days, the solubility of phosphate showed an increasing trend. The results showed that the highest phosphorus content in the soil was associated with the combined application of a high phosphorus level (40 mg per kg) along with humic acid and Streptomyces inoculation. Analysis of microbial biomass phosphorus revealed that the highest level was related to the treatment combining the highest level of phosphorus fertilizer and humic acid. According to the findings related to phosphatase enzymes, the combined application of the Streptomyces treatment, humic acid, and phosphorus resulted in an increase in the levels of these enzymes. Additionally, the results of microbial respiration in the soil indicated that the combined treatment of Streptomyces and the highest level of phosphorus fertilizer enhanced microbial respiration in the soil. The phosphorus content in the plants under the combined treatments of Streptomyces, humic acid, and phosphorus showed that the integration of Streptomyces inoculation and humic acid was effective in improving soil phosphorus availability and led to an increase in the phosphorus content of the plants. The results of this study showed that inoculation with the selected Streptomyces isolate, along with the combined application of humic acid, enhanced the efficiency of phosphorus fertilizer utilization, making it more readily available to the plant.

Conclusion

In general, the results of current study revealed that the simultaneous application of humic acid and *Streptomyces* inoculation led to an increase in the availability of phosphorus in the soil and the phosphorus content in the plants, as well as an improvement in the biochemical responses of the soil. However, field experiments are necessary to confirm its effectiveness.

Keywords: Actinobacterium, Microbial biomass phosphorus, Microbial respiration, Phosphatase

نشریه آب و خاک
https://jsw.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۹، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۴، ص. ۵۳-۳۵

افزایش دسترسی فسفر و تغییر پاسخ‌های بیوشیمیایی خاک با کاربرد اسیدهیومیک و مایه‌زنی *استرپتومایسس*

نیلوفر خلیلی[۱] - رضا قربانی نصرآبادی[۱*] - مجتبی بارانی مطلق[۱] - رضا خدادادی[۱]
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۰۶

چکیده

اکتینوباکتری‌ها از جمله گروه‌های میکروبی خاکزی بوده که دارای توانمندی آزادسازی فسفر از منابع کم محلول فسفر هستند و منجر به بهبود رشد گیاه می‌گردند. از طرفی اسیدهیومیک به‌عنوان یک ترکیب آلی محرک رشد نقش مهمی در تقویت حاصلخیزی و جامعه زیستی خاک دارد، که کاربرد تلفیقی آن‌ها سبب افزایش کارایی مصرف کودها به‌ویژه کودهای فسفره خواهد شد. بر این اساس هدف از پژوهش حاضر، تعیین میزان حل‌کنندگی فسفر توسط جدایه‌های *اکتینوباکتری* در زمان‌های مختلف انکوباسیون و بررسی اثر افزودن اسیدهیومیک بر میزان حلالیت فسفر توسط جدایه‌های اکتینوباکتری در شرایط آزمایشگاهی و نیز پایش تأثیر جدایه اکتینوباکتری منتخب و اسیدهیومیک در سطوح مختلف کودی فسفر بر میزان فسفر قابل دسترس خاک، فسفر گیاه و برخی خصوصیات بیوشیمیایی خاک بود. در این پژوهش تعداد پنج جدایه *اکتینوباکتری* مورد غربالگری قرار گرفتند. سپس اثر زمان انکوباسیون و کاربرد اسیدهیومیک بر توانمندی حلالیت فسفات جدایه‌های *اکتینوباکتری* مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور بررسی اثر جدایه *اکتینوباکتریایی* برتر منتخب و اثر متقابل آن با سطوح مختلف فسفر و کاربرد اسیدهیومیک، آزمایش گلدانی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با فاکتورهای آزمایش شامل: منبع معدنی فسفر در سه سطح فسفر از منبع مونوآمونیوم فسفات (شاهد، ۲۰ کیلوگرم فسفر خالص در هکتار، ۴۰ کیلوگرم فسفر خالص در هکتار)، مایه‌زنی *اکتینوباکتری* در دو سطح (شاهد، مایه‌زنی با جدایه منتخب)، کاربرد اسیدهیومیک در دو سطح (شاهد، کاربرد ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم) در سه تکرار بر روی گیاه ذرت رقم سینگل کراس ۷۰۴ صورت گرفت. در پایان آزمایش، مقدار فسفر قابل دسترس خاک و گیاه و همچنین پاسخ‌های بیوشیمیایی خاک اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، کاربرد اسیدهیومیک سبب افزایش میزان زیست‌توده میکروبی و افزایش آزادسازی فسفر به‌وسیله جدایه‌های *اکتینوباکتری* در شرایط آزمایشگاهی گردید. با افزایش زمان انکوباسیون از ۷ به ۱۴ روز میزان حلالیت فسفر روند افزایشی داشت. بررسی نتایج نشان داد که بیشترین میزان فسفر قابل دسترس خاک مربوط به کاربرد تلفیقی سطح بالای فسفر (۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) به همراه کاربرد اسیدهیومیک و مایه‌زنی *استرپتومایسس* بوده است. بررسی میزان فسفر زیست‌توده میکروبی نشان داد که بیش-ترین میزان آن مربوط به تیمار کاربرد تلفیقی بالاترین سطح کود فسفره و اسیدهیومیک بوده است. براساس نتایج حاصل از این پژوهش در رابطه با آنزیم‌های فسفاتاز، کاربرد تلفیقی تیمار *استرپتومایسس*، اسیدهیومیک و فسفر سبب افزایش میزان این آنزیم‌ها گردید. همچنین، نتایج تنفس میکروبی خاک نشان داد که تیمار تلفیقی *استرپتومایسس* و بالاترین سطح کود فسفره، سبب افزایش میزان تنفس میکروبی در خاک گردید. کاربرد تلفیقی مایه‌زنی *استرپتومایسس* و اسیدهیومیک در فراهمی فسفر قابل دسترس خاک مؤثر بوده و سبب افزایش محتوای فسفر گیاه گردید. بر اساس نتایج این پژوهش، کاربرد همزمان اسیدهیومیک و مایه‌زنی *استرپتومایسس* منجر به افزایش قابلیت دسترسی فسفر خاک و محتوای فسفر گیاه گردیده و همچنین منجر به بهبود پاسخ‌های بیوشیمیایی خاک گردید.

واژه‌های کلیدی: *اکتینوباکتری*، تنفس میکروبی، فسفاتاز، فسفر زیست‌توده میکروبی

۱- گروه مهندسی علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: rgnasr@yahoo.com)

https://doi.org/10.22067/jsw.2025.90227.1442

مقدمه

فسفر (P) از جمله عناصر غذایی اصلی برای رشد و نمو گیاهان بوده و نقش مهمی در سنتز DNA، اجزای غشای سلولی (فسفولیپیدها)، آدنوزین تری‌فسفات (ATP)، تنفس و فتوسنتز ایفا می‌کند (Peng *et al.*, 2021). فسفر در خاک به دو صورت فسفر آلی و فسفر معدنی وجود دارد. اگرچه بطور طبیعی، در خاک مقادیر زیادی فسفر وجود دارد اما معمولا برای گیاهان غیرقابل جذب و استفاده است (Divjot *et al.*, 2021). میزان جابجایی فسفر در خاک بسیار کم است و گیاهان نمی‌توانند مستقیما فسفر را جذب و مورد استفاده قرار دهند، که این موضوع منجر به کاهش رشد و عملکرد گیاه می‌شود (Peng *et al.*, 2021). کمبود فسفر، یک پدیده رایج در اکثر خاک‌های کشاورزی در سراسر جهان است و اکثر کشاورزان بطور مرتب از کودهای شیمیایی فسفره به‌منظور جلوگیری از کمبود فسفر در سیستم‌های زراعی استفاده می‌کنند (Chouyia *et al.*, 2020). با این حال اثرات جذب و تثبیت خاک بر روی فسفر، راندمان استفاده از کود را کاهش می‌دهد (Dong *et al.*, 2023). با توجه به اثرات مخرب استفاده از نهاده‌های شیمیایی و همچنین ضرورت تغییر مدیریت کوددهی و نیل به ترویج کشاورزی پایدار، استفاده از ریزجانداران خاک‌زی از جمله تکنیک‌های زیستی کارآمد در زمینه کشاورزی پایدار به‌منظور افزایش فراهمی عناصر غذایی برای گیاه می‌باشد (Shah & Wu, 2019). بکارگیری، شناخت و معرفی روش-های سازگار با محیط‌زیست، در جهت تأمین و فراهمی فسفر در خاک برای گیاهان در مبحث کشاورزی پایدار، برخلاف روش‌های شیمیایی و غیرسازگار با محیط‌زیست، بسیار مهم می‌باشد (Da costa *et al.*, 2015). میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات (PSMs[1]) قادر هستند ترکیبات آلی و معدنی فسفر غیرمحلول را هیدرولیز کرده و به شکل قابل استفاده برای گیاه تبدیل کنند (Sarmah & Sarma, 2023). این گروه از میکروارگانیسم‌ها بطور کلی شامل گونه‌هایی از باکتری های *Bacillus*، *Actinomycete*، *Trichiderma*، *Aspergillus*، *Penicillium*، *Rhizobium*، *Pseudomonas*، *Cyanobacteria*، *Calothrix braunii*، *Streptomyces* و *Streptoverticillium* می‌باشند (Kalayu, 2019).

اکتینوباکتری‌ها گروه متنوعی از باکتری‌های گرم مثبت هستند که از توانایی بالایی در حل کردن اشکال نامحلول فسفر از طریق مکانیسم‌های مختلف برخوردار می‌باشند. این گروه از میکروارگانیسم‌ها در کشاورزی بدلیل سازوکارهای انحلال فسفات، نقش‌های اکولوژیکی از جمله چرخه مواد مغذی، تجزیه مواد آلی و سرکوب پاتوژن‌های موجود در خاک و همچنین بکارگیری آن‌ها در جهت تولید محصولات پایدار، اهمیت بالایی دارند (Khan *et al.*, 2024). در میان میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات، اکتینوباکتری‌هایی از جمله *Actinoplanes*، *Streptomyces* و *Micromonospora* از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Aallam *et al.*, 2021). این گروه از محرک‌های رشد از جمله گروه‌های میکروبی مفید می‌باشند که ویژگی‌های محرک رشد آن‌ها به‌ویژه حلالیت فسفر و فراهمی آن برای گیاهان مورد توجه قرار گرفته است (Wahid *et al.*, 2016). سازوکار اصلی پیشنهاد شده برای آن‌ها، کاهش pH خاک و افزایش حلالیت فسفر و فراهمی آن در شرایط کمبود فسفر کل خاک می‌باشد (Ghorbani Nasrabadi *et al.*, 2023). میکروارگانیسم‌های محرک رشد گیاه، بخش مهمی از جامعه زیستی خاک هستند که به‌دلیل ظرفیت آن‌ها برای افزایش تولید محصول از طریق مکانیسم‌های مختلفی از جمله تثبیت بیولوژیکی نیتروژن، تولید فیتوهورمون‌ها، حل شدن فسفات و فرآیندهای کنترل زیستی شناخته شده هستند (Bashan *et al.*, 2014).

مواد هومیکی بطور عمده شامل اسیدهیومیک و اسیدفولویک بوده و از پیچیده‌ترین و فعال‌ترین ترکیبات آلی در خاک می‌باشند که از طریق سازوکارهایی سبب تحریک گیاه و فعالیت‌های میکروبی می‌گردند. مواد هیومیکی علاوه بر تأثیر مثبتی که در خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک، ساختار خاک و فعالیت جامعه میکروبی دارند، فراهمی عناصر غذایی برای گیاه را افزایش می‌دهند. به‌طوری‌که عنوان شده است اسیدهیومیک با تأثیر مثبت بر رشد ریشه گیاه و بهبود تولید ریشه‌های جانبی سبب افزایش جذب مواد غذایی می‌گردد (Ekin, 2019). اخیرا گزارش شده است که کاربرد تلفیقی باکتری-های محرک رشد و اسیدهیومیک به‌عنوان یک روش مفید در استفاده از محرک‌های زیستی برای گیاه بوده، که سبب بهبود رشد، افزایش عملکرد و جذب مواد غذایی می‌شوند (Esringü *et al.*, 2016; Pishchik *et al.*, 2016). اولیوارس و همکاران (Olivares *et al.*, 2017) گزارش کردند که کاربرد تلفیقی باکتری‌های محرک رشد و اسیدهیومیک به واسطه سازوکار مثبت تعاملی در افزایش فراهمی عناصر غذایی و انتقال آن در گیاه علاوه بر بهبود حاصلخیزی خاک سبب افزایش رشد گیاه می‌گردد. آن‌ها عنوان داشتند که مایه‌زنی باکتری‌های محرک رشد و کاربرد اسیدهیومیک یک روش مطلوب با اثرات مفید می‌باشد (Olivares *et al.*, 2017). خلیلی و همکاران (Khalili *et al.*, 2023) در بررسی مقایسه ای کاربرد اسیدهیومیک و *استرپتومایسس* در شرایط درون کشتگاهی میکروبی *(in vitro)* و آزمایش گلدانی بیان داشتند که کاربرد اسیدهیومیک سبب افزایش میزان حلالیت فسفر در محیط کشت‌های مختلف میکروبی فسفر گردید. همچنین نتایج آزمایش گلدانی حاکی از بهبود شاخص‌های

1- Phosphorus Solubilizing Microorganisms

رشدی، مورفولوژیک و فیزیولوژیک ذرت در سطوح مختلف فسفر بوده است.

پژوهشی که توسط اولیوارس و همکاران (Olivares *et al.*, 2015) انجام شد، بیان کرد مزایای زیادی در تعامل بین میکروارگانیسم‌ها و مواد آلی از طریق غنی‌سازی محیط بیولوژیکی توسط مایه تلقیح میکروبی وجود دارد. در پژوهش اکین (Ekin, 2019) پس از بررسی اثرات کاربرد اسید هیومیک و باکتری‌های محرک رشد بر عملکرد سیب‌زمینی بیان داشت که باکتری‌های محرک رشد به‌واسطه خصوصیات محرک رشدی شامل: تولید IAA و ACC د آمیناز، تثبیت بیولوژیک نیتروژن و حل کردن فسفر سبب افزایش عملکرد و بهبود اثرات مثبت اسید هیومیک گردید. بر این اساس اهمیت و جایگاه اسید هیومیک و باکتری‌های محرک رشد به‌ویژه اکتینوباکتری‌ها که نتایج کمی در زمینه دامنه تأثیر آن در بهبود تولیدات کشاورزی در ایران وجود دارد بایستی مورد توجه قرار گیرد. همچنین افزایش بهره‌وری مصرف محرک‌های رشدی و کودهای فسفاته در سیستم‌های کشاورزی پایدار امری ضروری می‌باشد. در این پژوهش فرض گردید توانمندی حل‌کنندگی جدایه-های اکتینوباکتریایی در طی دوره انکوباسیون متفاوت بوده و مایه‌زنی با جدایه منتخب *استرپتومایسس* و اثرات متقابل آن با اسید هیومیک و کود فسفره می‌تواند پاسخ‌های بیوشیمیایی خاک را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین هدف از پژوهش حاضر، غربالگری میزان حل‌کنندگی فسفر توسط جدایه‌های *اکتینوباکتری* در زمان‌های مختلف انکوباسیون، بررسی اثر افزودن اسیدهیومیک بر میزان حلالیت فسفر توسط جدایه‌های اکتینوباکتری و پایش تأثیر جدایه *اکتینوباکتری* منتخب و اسید هیومیک در سطوح مختلف کودی فسفر بر فراهمی فسفر قابل دسترس خاک، مقدار فسفر گیاه و تغییر پاسخ‌های بیوشیمیایی خاک بود.

مواد و روش

خالص‌سازی و انتخاب جدایه‌های باکتریایی

در این پژوهش تعداد پنج جدایه *اکتینوباکتریایی* که از ریزوسفر گیاهان زراعی: گندم، پنبه، جو، ذرت و یک گیاه مرتعی مقاوم به شوری و خشکی از اراضی استان گلستان جداسازی شده، برای غربالگری مورد استفاده قرار گرفتند. شناسایی اولیه آن بر اساس رشد در محیط‌کشت ISP_2 و بر اساس خصوصیات رشدی و مورفولوژیک انجام شد. به‌منظور اطمینان حاصل کردن از خالص بودن جدایه‌های *اکتینوباکتریایی* مورد استفاده در پژوهش، جدایه‌ها بازکشت شده و سپس خالص‌سازی در محیط‌کشت جامد عصاره مخمر–عصاره مالت آگار (که بر حسب گرم در لیتر شامل: عصاره مالت ۱۰، عصاره مخمر ۴، گلوکز ۴، آگار ۱۵) انجام گرفت. همچنین در نهایت جدایه برتر مورد استفاده در این پژوهش بر اساس توالی‌یابی ژن 16s rRNA شناسایی شد.

سنجش حلالیت فسفر در زمان‌های انکوباسیون و کاربرد اسیدهیومیک

جهت بررسی اثر زمان انکوباسیون و کاربرد اسیدهیومیک بر حلالیت فسفر توسط جدایه‌های اکتینوباکتریایی و همچنین انتخاب بهترین جدایه، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. فاکتورهای آزمایشی شامل: ۵ جدایه *اکتینوباکتری*، زمان انکوباسیون (۷، ۱۰ و ۱۴ روز) و اسیدهیومیک (کاربرد با غلظت ۰/۰۵ درصد حجمی محیط‌کشت و عدم کاربرد) در سه تکرار انجام گرفت. بعد از گذشت زمان و رشد مناسب و یکسان جدایه‌ها، در محیط پیش‌کشت عصاره مخمر–عصاره مالت، مایه‌زنی به میزان دو درصد حجمی محیط‌کشت NBRIP[1] (که بر حسب گرم در لیتر شامل: گلوکز ۱۰، منیزیم کلرید ۵، سولفات منیزیم ۰/۲۵، کلرید پتاسیم ۰/۲، سولفات آمونیوم ۰/۲، کلسیم کلرید ۰/۵، تری کلسیم فسفات ۵) انجام شد. در این پژوهش از اسیدهیومیک پودری با نام تجاری هیومکس (شامل ۸۰ درصد اسیدهیومیک و ۲۰ درصد اسید فولویک) با غلظت ۰/۰۵ درصد در محیط‌کشت استفاده شد. همه ارلن‌ها در طی زمان انکوباسیون در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سلسیوس با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه (rpm) قرار داده شدند. جهت اندازه‌گیری مقدار فسفر آزاد شده توسط جدایه‌های *اکتینوباکتریایی*، دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه (rpm) به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و یک میلی‌لیتر از محلول رو شناور با یک میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات وانادات و سه میلی لیتر آب دی‌یونیزه مخلوط گردید. نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفته و سپس مقدار جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مورد سنجش قرار گرفت. سپس با استفاده از غلظت‌های مختلف فسفر (۰–۲۰ میلی‌گرم در لیتر) منحنی استاندارد تهیه شده و مقدار آزادسازی فسفر جدایه‌ها بر حسب میلی‌گرم در لیتر (mg/L) محاسبه شد (Mehta & Nautiyal, 2001).

انتخاب و شناسایی جدایه برتر

بر اساس نتایج غربالگری حلالیت فسفر در زمان‌ها مختلف انکوباسیون با حضور اسید هیومیک، جدایه ۴۷ به‌عنوان جدایه برتر انتخاب گردید. و بر اساس نتایج توالی یابی مولکولی 16S rRNA دارای بیش‌ترین همولوژی با جدایه *استرپتومایسس* چارترئوسیس

1- National Botanical Research Institutes Phosphate Growth Medium

(*Streptomyces chartreusis*) بوده و با شماره دسترسی KJ152149 در پایگاه NCBI ثبت شده است.

آزمایش گلدانی

به‌منظور بررسی تأثیر جدایه باکتریایی برتر که براساس سنجش توانایی حلالیت فسفر، انتخاب شد و اثر متقابل آن با سطوح مختلف فسفر و کاربرد اسید هیومیک، آزمایش گلدانی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در ۳ تکرار به‌صورت آنالیز واریانس سه طرفه انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل: سه سطح فسفر با استفاده از منبع کودی مونوآمونیوم فسفات (شاهد، ۲۰ کیلوگرم فسفر خالص در هکتار معادل ۰/۰۵ گرم در گلدان، ۴۰ کیلوگرم فسفر خالص در هکتار معادل ۰/۱ گرم در گلدان)، مایه‌زنی در دو سطح (شاهد، مایه‌زنی با جدایه منتخب)، افزودن هیومیک اسید در دو سطح (شاهد، کاربرد ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم) بود. با توجه به اهداف این پژوهش، خاکی با میزان فسفر پایین بر اساس آزمون خاک برای انجام آزمایش انتخاب گردید (جدول ۱). خاک‌های مورد استفاده در پژوهش، از عمق ۰ تا ۳۰ سانتی‌متری محوطه پردیس دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان با مختصات جغرافیایی ۳۶ درجه ۵۰ دقیقه ۲۸/۸ ثانیه عرض شمالی و ۵۴ درجه، ۲۳ دقیقه و ۴۶/۶ ثانیه طول شرقی جمع‌آوری گردید و پس از هوا خشک کردن از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد. به‌منظور آماده‌سازی خاک، براساس آزمون خاک، جهت تأمین نیاز نیتروژن و پتاسیم، به‌ترتیب مقدار ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار اوره و همچنین ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار کلرید پتاسیم به خاک اضافه شد. همچنین سطوح مورد نظر فسفر از منبع کودی مونوآمونیوم فسفات به خاک گلدان‌ها اضافه شد. برای آماده‌سازی بذرها، تعداد کافی از بذور سالم ذرت رقم سینگل کراس ۷۰۴ انتخاب و به‌منظور ضدعفونی به‌مدت ۳۰ ثانیه در الکل قرار داده شدند. سپس ۲ تا ۳ دقیقه آن‌ها را در هیپوکلرید سدیم ۵ درصد قرار داده و در نهایت ۸ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. به‌منظور تهیه مایه میکروبی، جدایه برتر منتخب را در محیط عصاره مخمر-عصاره مالت به میزان مناسب و یکسان (10^7 سلول در هر میلی‌لیتر) رشد داده شد و بذرها را درون گلدان قرار داده و مقدار یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری روی بذرها مایه‌زنی گردید. کاربرد اسید هیومیک در این پژوهش در دو مرحله مهم از رشد رویشی گیاه (پس از گذشت ۱۰ روز از کاشت (استقرار گیاه) و پس از گذشت ۴۰ روز از کاشت (اواخر رشد رویشی)، بصورت کود آبیاری به خاک گلدان‌ها اضافه شد. پس از گذشت ۶۵ روز از کشت گیاه (اواخر دوره رشد رویشی)، نمونه‌برداری از خاک و گیاه برای آزمایشات انجام گرفت.

سنجش محتوی فسفر خاک و گیاه

فسفر خاک به روش اولسن با استفاده از عصاره‌گیر بی‌کربنات سدیم انجام شد. برای این منظور عصاره گیری از خاک‌ها انجام شده و پس از تهیه محلول استاندارد و محلول مخلوط، از هر محلول استاندارد، عصاره و شاهد، مقدار ۲۵ میلی‌لیتر برداشته و هر کدام در یک ارلن ۱۲۵ میلی‌لیتر ریخته شده و ۲۵ میلی‌لیتر از محلول مخلوط تهیه شده به هر یک اضافه شد. ارلن‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه (rpm) تکان داده شدند و بعد از صرف ۱ تا ۲ ساعت رنگ محلول درون ارلن‌ها به آبی تغییر پیدا کرد. میزان فسفر خاک در طول موج ۸۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت و محاسبه گردید (Olsen, 1954).

سنجش فسفر گیاه به روش هضم خشک با استفاده از معرف آمونیوم مولیبدات وانادات و محلول استاندارد مونو پتاسیم فسفات (KH_2PO_4) در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر ارزیابی گردید (Chapman & Pratt, 1962).

سنجش تنفس میکروبی پایه

پس از جدا نمودن ریشه‌ها، قسمتی از خاک گلدان‌ها به‌منظور اندازه‌گیری تنفس میکروبی پایه استفاده گردید. برای این منظور مقدار ۱۰ گرم خاک تازه داخل ارلن ریخته شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر سود ۰/۵ نرمال در لوله آزمایش ریخته و لوله داخل ارلن قرار داده شد. درب ارلن کاملا بسته شده و توسط پارافیلم درزگیری شد. همین مراحل برای نمونه شاهد (بدون خاک) نیز انجام شد. و نمونه‌ها به‌مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از گذشت یک هفته، به سود باقیمانده درون ظرف، ۱۰ میلی‌لیتر کلرور باریم ۰/۵ مولار و چند قطره معرف فنل فتالئین افزوده شده و با اسیدکلریدریک ۰/۵ نرمال تیتر شدند (Sparling *et al.*, 1990). که اجزای فرمول عبارتست از: B: اسید مصرفی شاهد (میلی‌لیتر)، S: اسید مصرفی نمونه خاک (میلی‌لیتر)، N: نرمالیه اسید، E: اکی‌والان وزن دی اکسید کربن

$$mgCO_2 = (B - S)\, N \times E$$

سنجش فسفر زیست‌توده میکروبی و فعالیت آنزیم فسفاتاز

فسفر زیست‌توده میکروبی (MBP) خاک از تفریق مقادیر غلظت فسفر در عصاره‌ی تیمارشده با کلروفرم و مقدار فسفر کل تیمار نشده با کلروفرم به روش هدلی و استوارت (Hedley & Stewart, 1982) اندازه‌گیری شد.

(۰/۴) / (فسفر عصاره‌گیری شده از خاک تدخین نشده − فسفر عصاره‌گیری شده از خاک تدخین شده) = فسفر زیست‌توده میکروبی

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک

Table 1- Physical and chemical properties of soil

شن Sand (%)	سیلت Silt (%)	رس Clay (%)	بافت خاک Soil Texture	اسیدیته خاک pH	کربن آلی Organic Carbon (%)	هدایت الکتریکی EC (dS m^{-1})	فسفرقابل جذب P_{ava} (mg kg^{-1})	پتاسیم‌قابل جذب K_{ava} (mg kg^{-1})	نیتروژن قابل جذب N_{av} (%)
12	64	24	لوم سیلتی Silty loam	7.2	0.8	0.85	5.7	277	0.06

EC: electrical conductivity; P_{ava}: available phosphorus; K_{ava}: available potassium; N_{av}: available nitrogen

جهت سنجش آنزیم فسفاتاز اسیدی یک گرم خاک مرطوب عبور داده شده از الک ۲ میلی‌متری در ارلن ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و سپس ۰/۲۵ میلی‌لیتر تولوئن جهت پلاسمولیز سلول‌ها و آزاد شدن آنزیم‌های درون سلولی (Alef & Nannipieri, 1995) و مقدار ۴ میلی‌لیتر بافر MUB[1] با pH: ۶/۵ به آن اضافه گردید. سپس یک میلی‌لیتر از محلول پارا-نیتروفنیل فسفات[2] (PNP) به نمونه‌ها اضافه شد. پس از پوشاندن ارلن‌ها، آن‌ها را مخلوط و به‌مدت یک ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از انکوباسیون، یک میلی‌لیتر محلول کلرید کلسیم ۰/۵ مولار (جهت جلوگیری از پراکنده شدن ذرات رس پس از اضافه کردن سود) و ۴ میلی‌لیتر سود ۰/۵ مولار (جهت استخراج پارا نیتروفنل از خاک) اضافه نموده و پس از مخلوط کردن نمونه‌ها، سوسپانسیون را صاف کرده و مقدار جذب پارا نیتروفنل (PNP) در محلول صاف شده در طول موج ۴۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد (Tabatabai & Bremner, 1969). به‌منظور سنجش آنزیم فسفاتاز قلیایی نیز یک گرم از خاک توزین شده، با ۰/۲۵ میلی‌لیتر تولوئن و ۴ میلی‌لیتر بافر MUB با pH: ۱۱ و یک میلی‌لیتر محلول سوبسترای پارانیتروفنل (همانند روش قبل) مخلوط کرده و پس از انکوباسیون، صاف گردید و سپس ۴ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۰/۵ مولار و یک میل لیتر کلرید سدیم ۰/۵ مولار برای اتمام فعالیت آنزیمی به آن افزوده شد و کاملا تکان داده شدند. سپس نمونه‌ها همانند روش قبل، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Tabatabai & Bremner, 1969).

تجزیه داده‌ها: آنالیز آماری و مقایسه میانگین بین تیمارهای مختلف با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD (در سطح احتمال ۵ درصد) استفاده شد. همچنین برای ترسیم نمودارها از برنامه Excel استفاده شد.

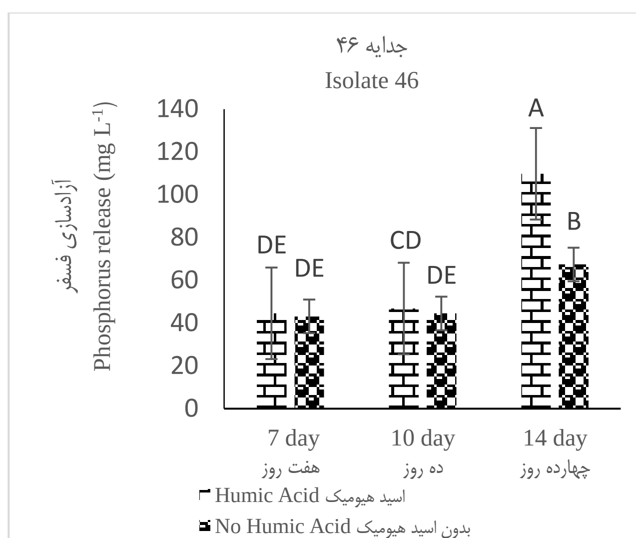
نتایج و بحث

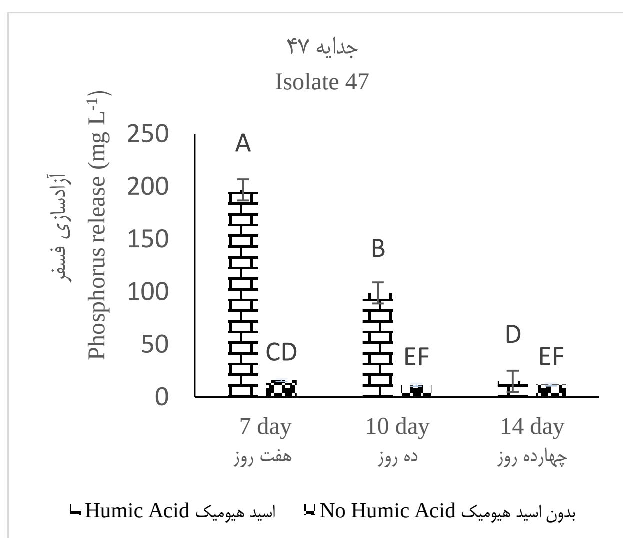
بررسی تأثیر اسید هیومیک و زمان انکوباسیون بر حلالیت فسفر توسط جدایه‌های اکتینوباکتریایی

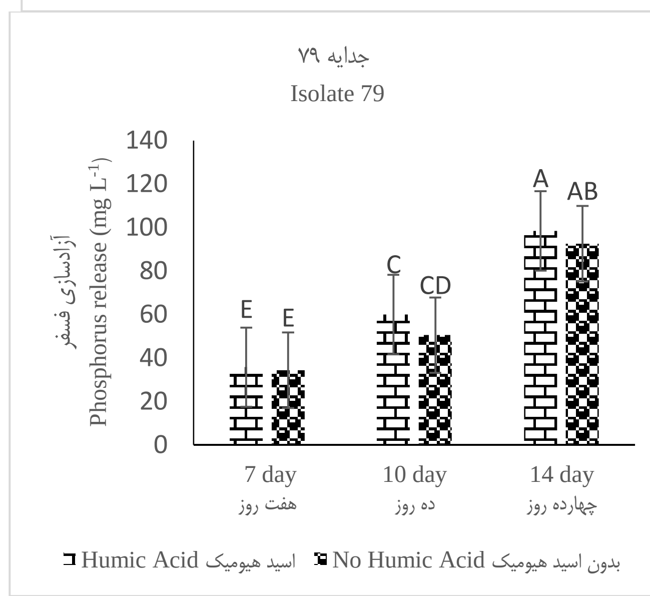
بر اساس نتایج، بیش‌ترین میزان آزادسازی فسفر با میانگین ۱۹۷/۰۵ میلی‌گرم در لیتر در جدایه ۴۷ با حضور اسید هیومیک در زمان هفت روز ثبت شد. بررسی نتایج حاکی از اثر مطلوب کاربرد اسید هیومیک در افزایش میزان حلالیت فسفر در جدایه‌های ۷۹، ۴۷، ۴۶، ۲۴ در زمان‌های انکوباسیون مشابه دارد. در سایر زمان‌های انکوباسیون نیز در همه جدایه‌ها، بجز جدایه ۷۴ در روز ۱۴، بیشترین مقدار آزادسازی فسفر درکاربرد اسید هیومیک به‌دست آمد (شکل ۱). اسید هیومیک به‌عنوان یک ماده مغذی کی لیت‌کننده، سبب فراهمی عناصر غذایی مورد نیاز رشد جدایه‌های باکتریایی می‌گردد (Yang *et al.*, 2009). فرهت و همکاران (Farhat *et al.*, 2015) در بررسی سازوکار حلالیت فسفر جدایه‌های *استرپتومایسس* (*Streptomyces* CTM396, CTM397) در حضور اسید هیومیک گزارش کردند که افزودن ۰/۰۵ درصد اسید هیومیک با اثر مثبت در افزایش زیست‌توده میکروبی سبب بهبود آزادسازی فسفر جدایه‌های باکتریایی شده که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. یوآن و همکاران (Yuan *et al.*, 2022) نیز بیان داشتند اسید هیومیک تأثیر مثبتی بر فراوانی جوامع میکروبی داشته و بطور کلی میزان فعالیت باکتری‌های حل کننده فسفات را بالا می‌برد. تأثیر زمان بر حلالیت فسفر جدایه‌های باکتریایی در سطح یک درصد معنی‌دار بود (شکل ۱). با افزایش زمان انکوباسیون از هفت به ۱۴ روز میزان حلالیت فسفر در جدایه‌های باکتریایی ۷۹، ۴۶، ۷۴ به‌ترتیب افزایش ۱۷۵/۰۶، ۱۴۶/۱۸، ۵۳۹/۸ درصدی نشان داد. درحالی‌که، در جدایه‌های ۲۴ و ۴۷ بیشترین میزان حلالیت فسفر در زمان هفت روز ثبت گردید و با گذشت زمان (تا ۱۴ روز) میزان حلالیت فسفر به‌ترتیب به میزان ۵۱/۸۶، ۹۲/۳۳ درصد کاهش پیدا کرد.

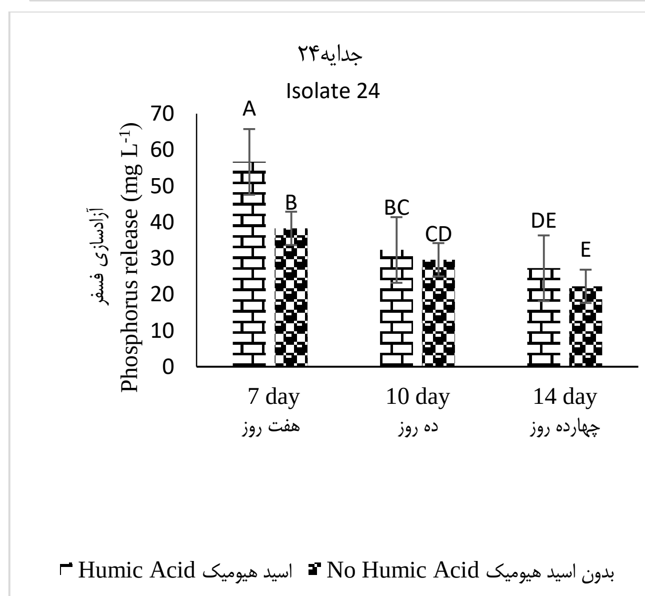
1- Modified Universal Buffer

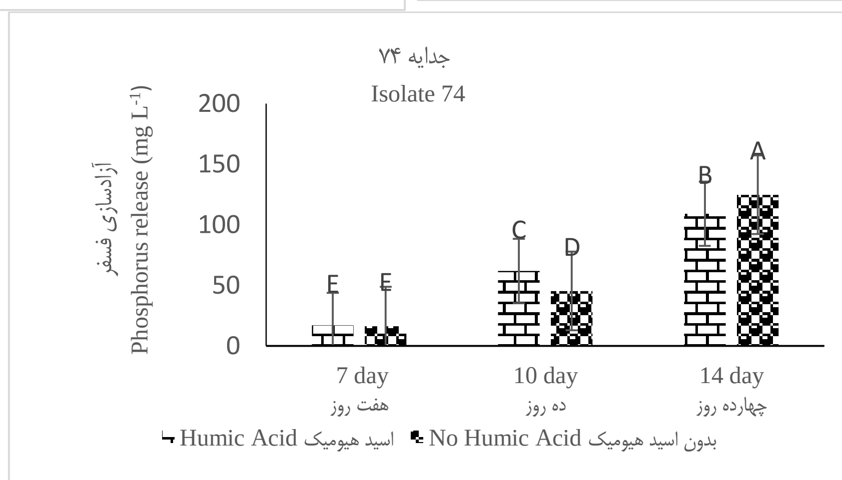
2- Para nitrophenyl phosphate











شکل ۱- اثر متقابل زمان و کاربرد اسیدهیومیک بر آزادسازی فسفر توسط جدایه‌های مورد مطالعه

Figure 1- The Interction of time and humic acid application on phosphorus release by the studied isolates

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر پارامترهای اندازه‌گیری شده در خاک و فسفر گیاه

Table 2- Analysis of variance for the effect of experimental treatments on measured soil parameters and plant phosphorus

منابع تغییرات S.O.V	محتوای فسفر گیاه Plant phosphorus content	فسفاتاز قلیایی Alkalin phosphatase	فسفاتاز اسیدی Acid phosphatase	تنفس میکروبی پایه Basic microbial respiration	فسفر زیست توده میکروبی Microbial biomass phosphorus	فسفر قابل دسترس Available P
فسفر (P)	0.0006 ns	2630.23**	284.40**	58.32 n.s	1.01 n.s	0.58*
استرپتومایسس (S)	0.001*	7017.97**	2705.21**	225 n.s	2.11*	0.59*
اسیدهیومیک (HA)	0.00004 ns	68.72**	805.14**	25 n.s	0.69 n.s	1.61**
استرپتومایسس × فسفر S × P	0.001**	3040**	182.02**	158.33*	1.32*	1.44**
فسفر × اسیدهیومیک HA × P	0.001**	5815.52**	316.03**	25 n.s	2.69**	0.57*
استرپتومایسس × اسیدهیومیک S × HA	0.001**	666.84**	104.34**	136.11 n.s	0.31 n.s	0.14 n.s
استرپتومایسس × اسیدهیومیک × فسفر S × HA × P	0.002**	6393.66**	1007.14**	36.11 n.s	0.008 n.s	2.53**
خطا Error	0.0002	2.17	3.31	38.88	0.37	0.13
ضریب تغییرات (٪) CV (%)	8.19	0.42	1.45	3.51	17.69	3.78

P: Phosphorus; S: *Streptomyces*; HA: Humic Acid

معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، * معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد، **n.s** عدم معنی‌داری

** Significant at 1%, * significant at 5%, ns non-significant

چاوهان و همکاران (Chauhan *et al.*, 2017) در بررسی حلالیت فسفر جدایه‌های باکتریایی (*Aneurinibacillus aneurinilyticus* strain CKMV1) بیان داشتند که افزایش زمان انکوباسیون سبب افزایش میزان حلالیت فسفر جدایه‌های باکتریایی گردید. آن‌ها ضمن اشاره به همبستگی مثبت میان افزایش زمان انکوباسیون و کاهش میزان pH محیط‌کشت، بیان داشتند که انکوباسیون ۱۲۰ ساعت بیش‌ترین میزان آزادسازی فسفر را نشان داد (Chauhan *et al.*, 2017). چویا و همکاران (Chouyia *et al.*, 2020) در بررسی میزان آزادسازی فسفر در شرایط آزمایشگاهی بیان داشتند که سویه‌های *Streptomyces roseocinereus* و *Streptomyces natalensis* پس از گذشت ۱۵ روز بیشترین میزان حلالیت فسفر را در شرایط آزمایشگاهی از خود نشان دادند.

فسفر خاک

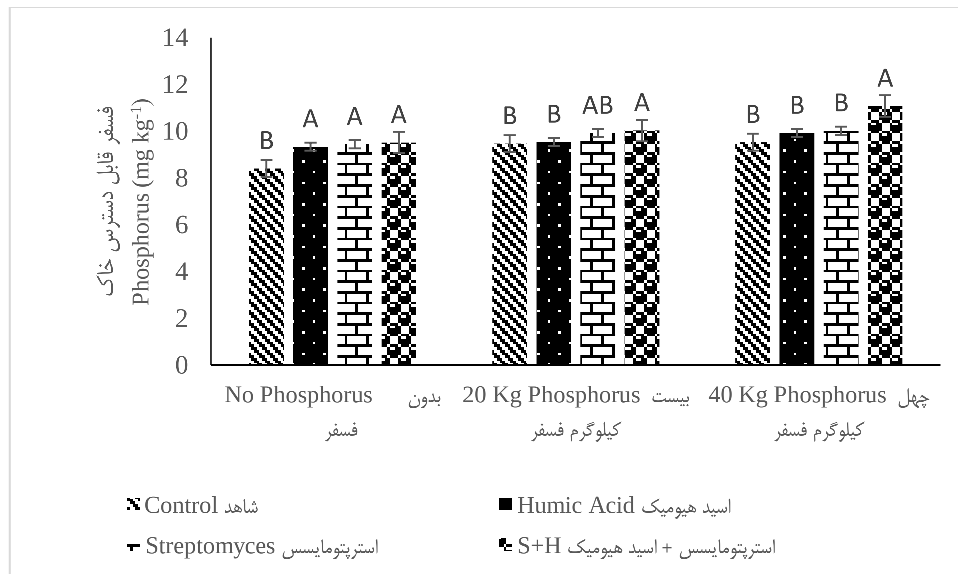
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل *استرپتومایسس* × اسیدهیومیک × فسفر در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). بر اساس نتایج مقایسه میانگین بیشترین مقدار فسفر قابل دسترس خاک در سه سطح کود فسفره مربوط به تیمار کاربرد تلفیقی مایه‌زنی *استرپتومایسس* و اسید هیومیک در بالاترین سطح فسفر (۴۰ کیلوگرم فسفر در هکتار) به میزان ۱۱/۰۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. که با افزایش ۱۶/۲۶ درصدی اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد سطح بالای فسفر (۴۰ کیلوگرم فسفر در هکتار) دارد (شکل ۲). این موضوع نشان دهنده تأثیر مثبت مایه‌زنی جدایه *استرپتومایسس* و کاربرد همزمان اسیدهیومیک در بهبود فراهمی فسفر قابل دسترس خاک می‌باشد. اسیدهیومیک ترکیبی از مولکول‌های آلی و طبیعی حاصل از تجزیه میکروبی مواد آلی بوده و در نتیجه می‌تواند تأثیر مثبتی بر جذب عناصر غذایی به‌ویژه فراهمی فسفر در خاک داشته باشد (Orsi, 2014). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تیمار تلفیقی کاربرد اسیدهیومیک و مایه‌زنی *استرپتومایسس* در سطح بالای فسفر به‌عنوان تیمار بهینه با افزایش ۱۱/۶۹ درصدی، اختلاف آماری معنی‌دار با تیمار کاربرد اسیدهیومیک در بالاترین سطح فسفر دارد (شکل ۲). باکتری‌های حل کننده فسفات توانایی تنظیم چرخه فسفر خاک با استفاده از سازوکارهای ترشح اسیدهای آلی و تولید آنزیم فسفاتاز را دارا بوده و از این راه سبب افزایش میزان فراهمی فسفر و بهبود جذب آن در گیاه می‌گردد (Pang *et al.*, 2024). سازوکار افزایش جذب و انتقال فسفر در گیاه توسط باکتری‌های حل کننده فسفات ترشح

اسیدهای آلی، اگزوپلی ساکارید و آنزیم فسفاتاز عنوان شده است (Yadav *et al.*, 2017). رئیسی و حسین پور (Raiesi & Hosseinpur, 2013) گزارش کردند مایه‌زنی جدایه‌های باکتریایی به‌دلیل تأثیر در افزایش حلالیت فسفر، سبب افزایش جذب فسفر گیاه و همچنین افزایش میزان فسفر قابل دسترس خاک می‌گردد. کاربرد کودهای فسفره و اسیدهیومیک، سبب افزایش میزان فسفر کل و فسفر قابل جذب خاک شده و کاربرد تلفیقی اسیدهیومیک و کود فسفره بیشترین میزان محتوی فسفر قابل دسترس خاک را در مقایسه با عدم کاربرد اسیدهیومیک به ثبت رساند (Silva *et al.*, 2023). پژوهش چوییا و همکاران (Chouyia *et al.*, 2020) بر روی میزان حلالیت فسفر جدایه‌های مختلف *استرپتومایسس* به روش غربالگری نیمه کمی صورت گرفت. آنها بیان داشتند که جدایه‌های *Streptomyces roseocinereus* و *Streptomyces natalensis* بیشترین میزان حلالیت فسفر را بصورت مقادیر حداکثر شاخص انحلال فسفر به‌ترتیب با مقادیر ۱/۷۵ و ۱/۶۳ در شرایط آزمایشگاهی و با استفاده از محیط‌کشت پیکووسکی از خود نشان دادند. همچنین در مراحل آزمون گلدانی بر روی گیاه یولاف، گیاهان تلقیح شده در مقایسه با گیاهان تلقیح نشده، افزایش معنی‌داری را در میزان حلالیت فسفر ارائه دادند.

فسفر زیست‌توده میکروبی

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر متقابل فسفر × اسید هیومیک در سطح آماری یک درصد و مایه‌زنی *استرپتومایسس* × فسفر و همچنین اثر اصلی باکتری در سطح آماری پنج درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). مقایسه میانگین اثر متقابل فسفر × اسید هیومیک نشان داد که بیشترین میزان در تیمار کاربرد اسید هیومیک در بالاترین سطح فسفر (۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) با میانگین ۴/۴۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوده که به‌ترتیب با افزایش ۴۶/۲ و ۳۵ درصد اختلاف معنی‌دار با کاربرد بالاترین سطح فسفر و شاهد داشت (شکل ۳). فسفر زیست‌توده میکروبی بعنوان شاخصی از حاصلخیزی فسفر خاک در مدیریت فسفر در کشاورزی عنوان شده است. به عبارتی تنظیم گردش و فراهمی فسفر قابل دسترس خاک که حاصل از تجزیه بقایای گیاهی، حیوانی و تجمع فسفات بوده است، بر عهده ریزجانداران خاک می‌باشد. علاوه بر این بخشی از فسفر فراهم خاک در داخل زیست‌توده میکروبی تجمع پیدا می‌کند که تحت عنوان فسفر زیست‌توده میکروبی (MBP) شناخته می‌گردد (Peng *et al.*, 2021). کوزولینو و همکاران (Cozzolino *et al.*, 2021) در بررسی کاربرد باکتری‌های حل کننده فسفر و اسید هیومیک گزارش کردند کاربرد همزمان باکتری‌های محرک رشد و اسید هیومیک، تأثیرات مثبت معنی‌دار بر میزان فسفر زیست‌توده میکروبی دارد.

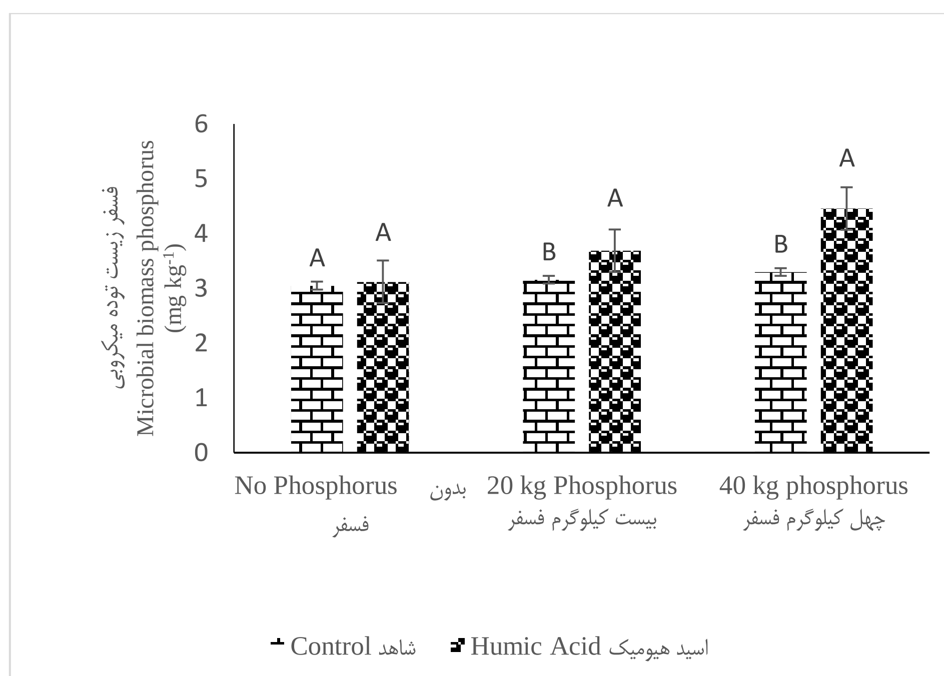
بررسی نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار *استرپتومایسس* × فسفر نشان داد که بیشترین میزان فسفر زیست‌توده میکروبی در تیمار تلفیقی مایه‌زنی باکتری و مصرف بالاترین سطح فسفر (۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) با میانگین ۴/۳۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم ثبت گردید که با افزایش ۳۷/۱۸ درصد اختلاف آماری معنی‌دار با تیمار کاربرد فسفر به تنهایی نشان داد (شکل ۴).



شکل ۲- اثر متقابل *استرپتومایسس* و اسید هیومیک و کود فسفر بر میزان فسفر قابل دسترس خاک

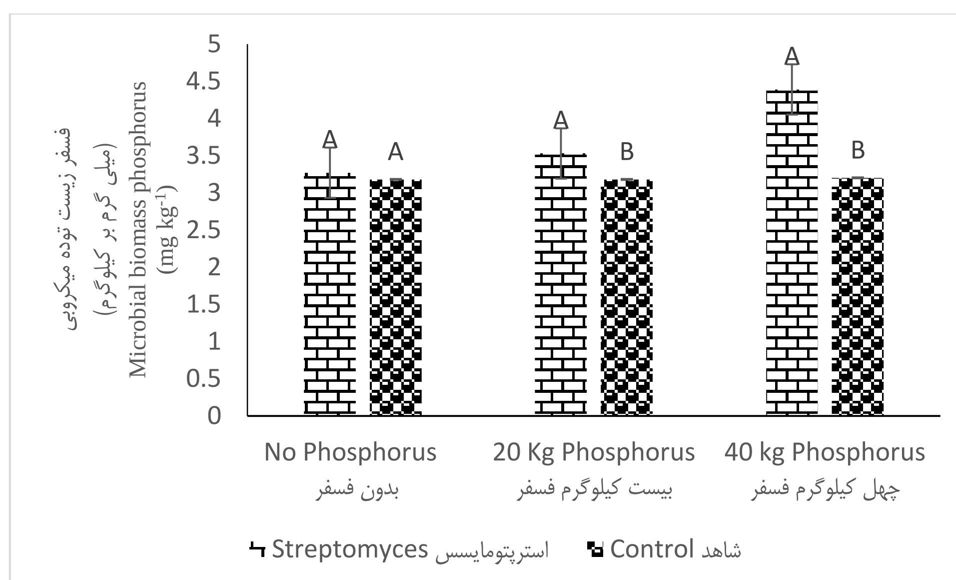
Figure 2- The interactive effect of *Streptomyces*, humic acid and phosphorus fertilizer on soil available phosphorus

کرمی و همکاران (Karami *et al*., 2021) در بررسی تغییرات فسفر زیست‌توده میکروبی در نتیجه کاربرد باکتری‌های محرک رشد (*Pantoea agglomerans*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Sphigobium yanoikuyae*, *Pseudomonas putida*) و منبع کودی فسفر بیان داشتند که تیمار کاربرد تلفیقی باکتری‌های محرک رشد و کود فسفره سبب افزایش معنی‌دار میزان فسفر زیست‌توده میکروبی در مقایسه با شاهد شده است. آن‌ها بیان داشتند که باکتری‌های حل کننده فسفات با ترشح اسیدهای آلی و معدنی سبب کاهش pH و آزادسازی فرم ویژه‌ای از فسفر محلول در ریزوسفر شده که در نتیجه آن سبب افزایش فسفر زیست‌توده میکروبی می‌گردد.



شکل ۳- اثر متقابل کود فسفر و اسید هیومیک بر میزان فسفر زیست‌توده میکروبی

Figure 3- The interactive effect of phosphorus fertilizer and humic acid on microbial biomass phosphorus levels

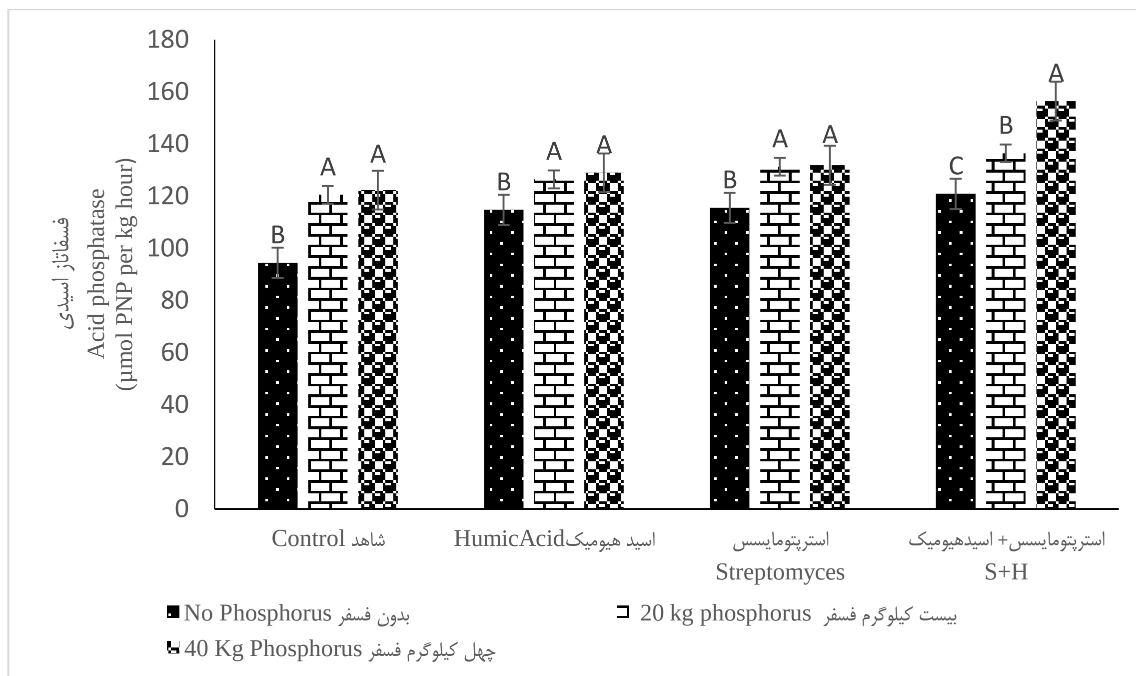


شکل ٤- اثر متقابل *استرپتومایسس* و کود فسفر بر میزان فسفر زیست‌توده میکروبی

Figure 4- The interactive effect of *Streptomyces* and phosphorus fertilizer on microbial biomass phosphorus levels

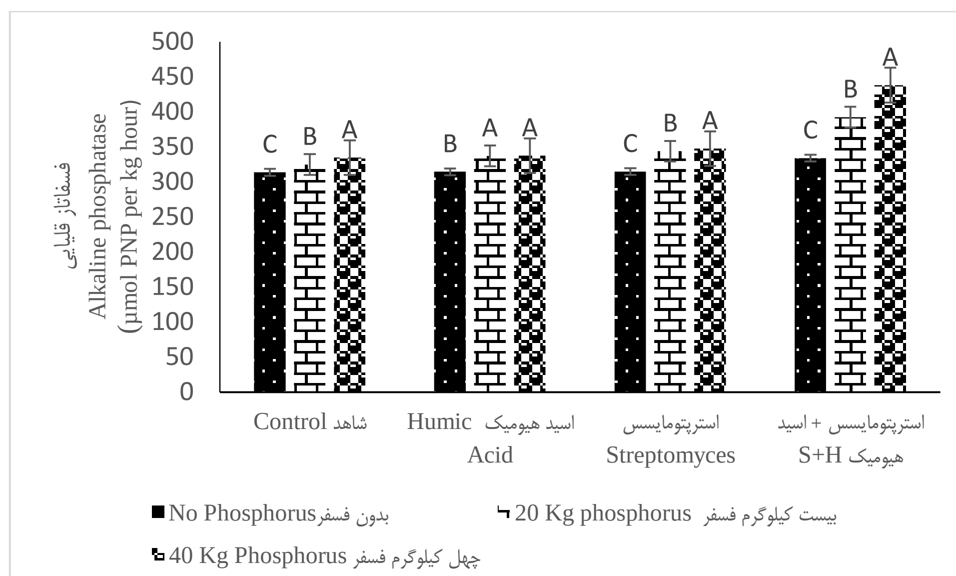
فسفاتاز اسیدی و قلیایی

بر اساس نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، اثر متقابل تیمارهای *استرپتومایسس* × اسید هیومیک × فسفر بر فسفاتاز اسیدی و قلیایی در سطح آماری یک درصد معنی‌دار شد. بررسی نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیش‌ترین میزان فسفاتاز اسیدی (۱۵۶/۴۵ میکرومول PNP در کیلوگرم بر ساعت) و قلیایی (۴۳۸/۰۹ میکرومول PNP در کیلوگرم بر ساعت) در تیمار کاربرد تلفیقی مایه‌زنی *استرپتومایسس* و اسیدهیومیک در بالاترین سطح فسفر ثبت گردید (شکل ۵ و ۶) که به‌ترتیب با افزایش ۶۵/۶۶ و ۳۹/۶۳ درصدی اختلاف آماری معنی‌دار نسبت به شاهد داشت. اسپان و کوزیاکوف (Spohn & Kuzyakov, 2013) بیان داشتند که افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز در نتیجه کاربرد سطح بالای کود فسفر، می‌تواند ناشی از فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز تثبیت شده در خاک باشد که به محتوی فسفر، غیر حساس است. فعالیت‌های آنزیمی در خاک از منابع مختلف صورت گرفته و علاوه بر فعالیت‌های آنزیمی ناشی از بخش زنده خاک، سایر بخش‌ها، از جمله آنزیم‌های تثبیت شده بر روی سطوح ذرات، نیز در فعالیت آنزیمی نقش دارند. آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی یکی از آنزیم‌های ضروری در چرخه فسفر بوده که تغییرات آن، وابسته به تغییر و تبدیلات فراهمی فسفر در خاک می‌باشد، بنابراین فعالیت این آنزیم می‌تواند بعنوان شاخصی از قابلیت فراهمی فسفر برای گیاهان و ریزجانداران خاک قلمداد گردد (Sheikhloo & Rasouli Sadaghiani, 2016). بچتائویی و همکاران (Bechtaoui *et al.*, 2020) در نتیجه کاربرد باکتری‌های محرک رشد (*Rahnella aquatilis* (PGP30) و *Pseudomonas brassicacearum* (PGP291)) و (*Rhizobium* sp. (RhOF57A) در گیاه *باقلا* (*Vicia faba*) بیان داشتند که مایه‌زنی باکتری سبب افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز در ریزوسفر و همچنین بهبود فراهمی فسفر گردید (Bechtaoui *et al.*, 2020). خالید و همکاران (Khalid *et al.*, 2023) در بررسی اثر کاربرد کنسرسیومی از باکتری‌های محرک رشد در گیاه ماش بیان داشتند که مایه‌زنی سبب افزایش معنی‌دار (۵۳ تا ۶۸ ٪) فعالیت آنزیم فسفاتاز (اسیدی و قلیایی) و همچنین محتوی فسفر گیاه نسبت به شاهد (عدم مایه‌زنی) گردید. توانایی تولید آنزیم فسفاتاز باکتری‌های حل کننده فسفر، سبب تسهیل هیدرولیز ترکیبات آلی و معدنی شدن فسفر در خاک شده که از این راه سبب افزایش فراهمی و انتقال فسفر در خاک و همچنین بهبود جذب گیاه می‌گردد (Rawat *et al.*, 2021 ; Liu *et al.*, 2024). شمس الدین و همکاران (Shams El-Deen *et al.*, 2020) در مطالعه تأثیر مایه‌زنی باکتری‌های *Bacillus megaterium* و *Serratia marcescens* در گندم بیان داشتند که مایه‌زنی سبب افزایش قابل توجه فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در خاک در مقایسه با شاهد (عدم مایه‌زنی) گردید.



شکل ۵- اثر متقابل *استرپتومایسس* و اسید هیومیک و فسفر بر میزان آنزیم فسفاتاز اسیدی

Figure 5- The interactive effect of *Streptomyces*, humic acid and phosphorus on the amount of acid phosphatase enzyme



شکل ٦- اثر متقابل *استرپتومایسس* و اسید هیومیک و فسفر بر میزان آنزیم فسفاتاز قلیایی

Figure 6- The interactive effect of *Streptomyces*, humic acid and phosphorus on the amount of alkaline phosphatase enzyme

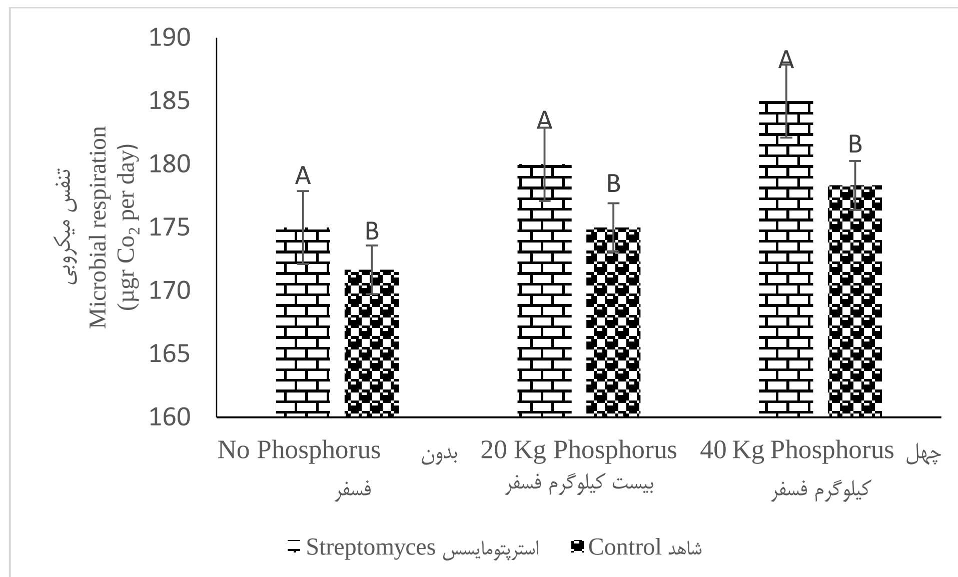
تنفس میکروبی

بررسی نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تنها اثر متقابل تیمار فسفر × *استرپتومایسس* درسطح آماری پنج درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). بر اساس نتایج مقایسه میانگین بیش‌ترین میزان تنفس میکروبی در تیمار کاربرد تلفیقی مایه‌زنی *استرپتومایسس* و بالاترین سطح فسفر به میزان ۱۸۵ میکروگرم دی اکسید کربن در روز ثبت گردید (شکل ۷). بررسی مقایسه‌ای نتایج نشان داد که مایه‌زنی *استرپتومایسس* در سطوح بدون فسفر، ۲۰ و۴۰ کیلوگرم فسفر به‌ترتیب سبب افزایش ۱/۹، ۲/۸ و ۳/۷ درصد گردید که بیش‌ترین افزایش مربوط به سطح بالای فسفر مصرف شده بود. که این موضوع نشان‌دهنده‌ی اثر مثبت کاربرد تلفیقی *استرپتومایسس* و کود فسفر در بهبود تنفس میکروبی می‌باشد. به نظر می‌رسد با توجه به اینکه خاک مورد استفاده کمبود فسفر داشت، افزودن فسفر به خاک و مایه‌زنی *استرپتومایسس*، سبب افزایش میزان فعالیت میکروبی و در نتیجه افزایش تنفس میکروبی در خاک شده باشد. ده شیخ و همکاران (Dehsheikh *et al*., 2020) در بررسی باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن (*Azotobacter vinlandi*) و حل‌کننده فسفر (*Pseudomonas putida* و *Pantoea agglomerans*) در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* var. *thyrsiflorum*) بیان داشتند که مایه‌زنی سبب افزایش ۶۰ درصدی میزان تنفس میکروبی خاک درگیاه ریحان هلندی (Thai basil) شد. همچنین، صادقی و همکاران (Sadeghi *et al*., 2023) بیان داشتند که استفاده از کمپوست و کود فسفره منجر به افزایش تنفس میکروبی شده و مقدار افزایش تنفس میکروبی در سطوح بالاتر فسفر، بیشتر بود.

پژوهش دیگری که توسط ژانگ و همکاران (Zhang *et al*., 2021) صورت گرفت نشان داد که افزودن منبع فسفر بصورت NaH_2PO_4 به تنهایی سبب افزایش میزان تنفس میکروبی گردید. همچنین اسمیت (Smith, 1994) گزارش کرد که افزودن سطوح فسفر از منابع فسفره مختلف، به خاک‌های دارای کمبود فسفر، سبب افزایش میزان تنفس میکروبی خواهد شد. در این راستا می‌توان به پژوهش صورت گرفته توسط وو و همکاران (Wu *et al*., 2022) نیز اشاره کرد که بیان داشتند افزودن فسفر مستقیما با افزایش فسفر قابل دسترس خاک، می‌تواند بر میکروارگانیسم‌های خاک و میزان متابولیت‌های مختلف آنها تأثیرگذار باشد.

محتوی فسفر گیاه

نتایج تجزیه واریانس حاکی از معنی‌داری اثر متقابل تیمار *استرپتومایسس* × اسید هیومیک × فسفر در سطح آماری یک درصد می‌باشد (جدول ۲). بررسی نتایج نشان داد که همچنان که تیمار کاربرد تلفیقی مایه‌زنی *استرپتومایسس* و بالاترین سطح فسفر (۴۰ کیلوگرم در هکتار) به همراه اسید هیومیک، به‌عنوان تیمار بهینه در افزایش فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز و فسفر زیست‌توده میکروبی ثبت گردید، بیش‌ترین میزان محتوی فسفر گیاه هم در این تیمار با میانگین ۰/۲۳ درصد مشاهده شد (شکل ۸). بر این اساس می‌توان بیان داشت که کاربرد تیمار تلفیقی با بهبود زیست‌فراهمی فسفر در خاک سبب افزایش محتوی فسفر در گیاه شده است.



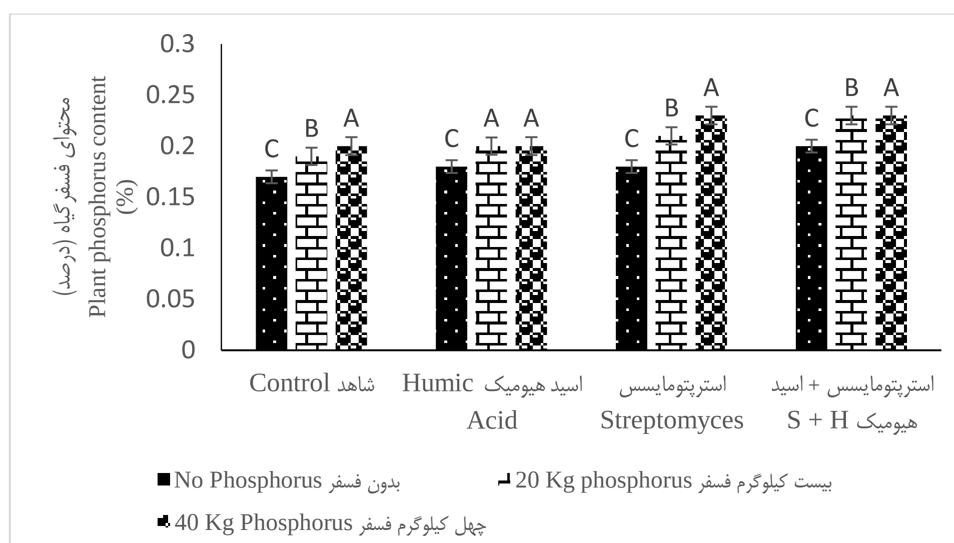
شکل ۷- اثر متقابل فسفر و *استرپتومایسس* بر میزان تنفس میکروبی

Figure 7- The interactive effect of phosphorus and *Streptomyces* on microbial respiration

به عبارتی دیگر مایه‌زنی *استرپتومایسس* با بهبود تولید آنزیم‌های فسفاتاز (اسیدی و قلیایی) و اسیدهای آلی سبب افزایش فراهمی فسفر با تبدیل فسفر آلی و معدنی به فرم‌های قابل جذب در ریزوسفر شده است. این در حالی است که اسید هیومیک با بهبود فعالیت میکروبی، افزایش نفوذپذیری غشای ریشه و تشکیل کمپلکس‌های پایدار با کاتیون‌ها قابلیت دسترسی فسفر در خاک را تقویت نموده است. که در نتیجه کاربرد تلفیقی مایه‌زنی *استرپتومایسس* و اسید هیومیک همراه با کود فسفر، نه تنها فسفر زیست‌توده میکروبی را به‌عنوان مخزن موقت فسفر افزایش داده است، بلکه چرخه معدنی‌سازی و فراهمی فسفر در خاک و گیاه را افزایش داده است. چابوت و همکاران (Chabot *et al.*, 1996) بیان داشتند که علی‌رغم مصرف کودهای فسفره در خاک، اغلب آن‌ها به راحتی برای گیاه قابل دسترس نبوده و پاسخ عملکردی ناچیزی در گیاهان ایجاد می‌شود. افضل و همکاران (Afzal *et al.*, 2019) بیان داشتند که باکتری‌های محرک رشد می‌توانند با حلالیت فسفات از طریق تولید اسیدهای آلی، آنزیم فسفاتاز و تولید ترکیبات کلات کننده سبب افزایش معدنی‌سازی و فراهمی فسفر می‌گردد. همچنین رزا و همکاران (Rosa *et al.*, 2022) در پژوهشی با هدف کاربرد باکتری‌های محرک رشد و سطوح فسفر در گیاه نیشکر بیان داشتند که مایه‌زنی با باکتری‌های محرک رشد غلظت بالاتری از فسفر در گیاه را به ثبت رساند. همچنین نتایج آن‌ها نشان داد که مقدار بیش‌تری از فسفر کودی به علت جذب توسط کلوئیدهای خاک به سرعت از دسترس گیاه خارج می‌شود. که کاربرد برخی از باکتری‌های محرک رشد قادر به افزایش دسترسی فسفر در گیاه می‌باشند. بررسی مقایسه‌ای نتایج نشان داد که کاربرد تلفیقی مایه‌زنی *استرپتومایسس* × اسید هیومیک در دو سطح فسفر تفاوتی معنی‌داری در میزان محتوی فسفر گیاه نداشتند. اما کاربرد تلفیقی در مقایسه با تیمار شاهد در دو سطح ۲۰ کیلوگرم و ۴۰ کیلوگرم فسفر به‌ترتیب افزایش معنی‌دار ۲۱/۰۵ و ۱۵ درصدی را نشان داد. در پژوهش قربانی نصرآبادی و همکاران (Ghorbani Nasrabadi *et al.*, 2023) مایه‌زنی دو جدایه *استرپتومایسس* انتخابی *Streptomyces* sp. UTMC 1478 (*Streptomyces* sp. 47 و 63) باعث افزایش میزان فسفر (۲۰ تا ۳۳٪) شد. آن‌ها عنوان داشتند که کاربرد ترکیبی جدایه‌های *استرپتومایسس* و منابع مختلف فسفر (از جمله تری کلسیم فسفات، سوپرفسفات تریپل و فیتات کلسیم) علاوه بر افزایش رشد ذرت، سبب افزایش محتوای فسفر گیاه گردید. همچنین در پژوهش صورت گرفته توسط پانده و همکاران (Pande *et al.*, 2017) نیز نتایج نشان دهنده اثر مثبت کاربرد باکتری‌های حل کننده فسفات بر افزایش جذب فسفر در اندام هوایی ذرت بود. کوزولینو و همکاران (Cozzolino *et al.*, 2021) در بررسی کاربرد باکتری محرک رشد و اسید هیومیک بیان داشتند که مایه‌زنی باکتری‌های محرک رشد افزایش محتوی فسفر گیاه را به همراه دارد.

همبستگی پارامترهای فسفر در خاک و گیاه

محاسبه ضرایب همبستگی بین پارامترهای اندازه‌گیری شده در خاک و فسفر گیاه حاکی از همبستگی مثبت و معنی‌دار آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی، اسیدی و تنفس میکروبی خاک با محتوی فسفر گیاه و فسفر قابل دسترس خاک می‌باشد. همچنین بررسی نتایج نشان داد که در بین غلظت فسفر قابل دسترس خاک و محتوی فسفر گیاه همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد.



شکل ۸- اثر متقابل *استرپتومایسس* و اسید هیومیک و فسفر بر میزان غلظت فسفر گیاه

Figure 8- The interactive effect of *Streptomyces*, humic acid and phosphorus on the amount of plant phosphorus content

جدول ۳- نتایج همبستگی پیرسون بین خصوصیات خاک و فسفر گیاه در تیمارهای مختلف

Table 3- Pearson correlation coefficients between soil properties and plant phosphorus across the treatments

متغیرها Variables	فسفر گیاه Plant phosphorus	فسفر زیست‌توده میکروبی Microbial biomass phosphorus	فسفاتاز قلیایی Alkaline phosphatase	فسفاتاز اسیدی Acid phosphatase	تنفس میکروبی پایه Basic microbial respiration	فسفر خاک Soil phosphorus
فسفر گیاه Plant phosphorus	1					
فسفر زیست‌توده میکروبی Microbial biomass phosphorus	-0.295$^{n.s}$	1				
فسفاتاز قلیایی Alkaline phosphatase	**0.896	-0.269 $^{n.s}$	1			
فسفاتاز اسیدی Acid phosphatase	**0.726	-0.059 $^{n.s}$	0.725 *	1		
تنفس میکروبی Microbial respiration	**0.417	-0.256$^{n.s}$	0.651 *	0.529 $^{n.s}$	1	
فسفر خاک Soil phosphorus	**0.69	-0.092 $^{n.s}$	0.79 *	0.817 *	0.472 $^{n.s}$	1

**معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، * معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد، n.s عدم معنی‌داری

** Significant at 1%, * significant at 5%, ns non-significant

بیش‌ترین میزان ضریب همبستگی مربوط به همبستگی مثبت میان فسفاتاز قلیایی و فسفر گیاه با ضریب همبستگی ۰/۸۹۶ و همچنین فسفاتاز اسیدی با فسفر قابل دسترس خاک با ضریب همبستگی ۰/۸۱۷ می‌باشد (جدول ۳).

در پژوهش انجام شده توسط حسینی و همکاران (Hoseini *et al.*, 2023) که تلقیح میکروبی با *Rhizophagos intraradices* و

Serendipita indica به بذر گیاه ذرت (*Zea mays*) انجام شد، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی با میزان فسفر قابل دسترس خاک با ضرایب همبستگی ۰/۷۸ و ۰/۸۱ بدست آمد که تأثیر فعالیت آنزیم‌ها را بر افزایش دسترسی فسفر نشان داد. طبق پژوهش مارگالف و همکاران (Margalef *et al*., 2017)، از آنجایی که بطور کلی افزودن کودهای فسفره به خاک روی حفظ رشد و انجام متابولیسم‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها و سایر فعالیت‌ها و همچنین روی افزایش میزان آنزیم فسفاتاز قلیایی مؤثر است، بنابراین می‌توان گفت افزایش میزان فسفر قابل دسترس خاک به واسطه افزودن کودهای فسفره در پژوهش حاضر، می‌تواند دلیلی مؤثر برای ایجاد همبستگی مثبت بین میزان فسفر قابل استفاده و میزان فسفاتاز قلیایی نیز باشد. نتایج به‌دست آمده از پژوهش ناهیدان و قاسم زاده (Nahidan & Ghasmzadeh, 2022) نشان داد که تغییرات فعالیت‌های میکروبی و آنزیم‌های مرتبط با چرخه فسفر از جمله فسفاتازها می‌توانند بر فسفر قابل دسترس خاک، تأثیرگذار باشند. همچنین در این پژوهش، همبستگی مثبت و معنی‌دار بین فسفر قابل دسترس با تنفس میکروبی و فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی دیده شد.

نتیجه‌گیری

جدایه‌های *اکتینوباکتری* مورد بررسی در این پژوهش پاسخ مناسبی به حلالیت فسفر در نتیجه ی افزودن اسید هیومیک به محیط‌کشت نشان دادند. بررسی نتایج نشان داد که ۶۰ درصد از جدایه‌های *اکتینوباکتر*، با افزایش زمان انکوباسیون از ۷ به ۱۴روز حلالیت فسفر افزایشی داشتند این در صورتی بود که ۴۰ درصد جدایه‌ها روندی کاهشی در میزان حلالیت فسفر به ثبت رساندند. بر اساس نتایج کاربرد تلفیقی *استرپتومایسس* و اسید هیومیک به‌عنوان یک راهکار زیستی مؤثر، سبب افزایش زیست‌فراهمی فسفر در خاک و جذب آن توسط گیاه از طریق مکانیسم‌های هم‌افزا شده است. به‌طوری‌که تیمار کاربرد تلفیقی *استرپتومایسس* و اسید هیومیک در سطح بالای فسفر بیش‌ترین میزان فسفر قابل دسترس خاک، فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی، فسفر زیست‌توده میکروبی و محتوی فسفر گیاه را به ثبت رساند. بررسی نتایج نشان داد که مایه‌زنی *استرپتومایسس* درسطح بالای فسفر روند افزایشی در میزان تنفس میکروبی پایه خاک نشان داد که این موضوع حاکی از پاسخ مثبت جامعه زیستی خاک به کاربرد تلفیقی مایه‌زنی *استرپتومایسس* و مصرف کود فسفر می‌باشد. به‌طور کلی کاربرد تلفیقی مایه‌زنی *استرپتومایسس*، اسید هیومیک و مصرف ۴۰ کیلوگرم فسفر در هکتار با بهبود شرایط زیستی مرتبط با فسفر در خاک نقش مهمی در زیست‌فراهمی فسفر در خاک و گیاه داشته، که برای اطمینان بیش‌تر انجام آزمایش مزرعه‌ای برای اثبات کارایی آن ضروری است.

References

1. Aallam, Y., Dhiba, D., Lemriss, S., Souiri, A., Karray, F., Rasafi, T.E., & Hamdali, H. (2021). Isolation and characterization of phosphate solubilizing *Streptomyces* sp. endemic from sugar beet fields of the Beni-Mellal region in Morocco. *Microorganisms*, *9*, 914. https://doi.org/10.3390/microorganisms9050914
2. Afzal, I., Shinwari, Z.K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, *221*, 36-49. https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001
3. Alef, K., & Nannipieri, P. (1995). Methods in applied soil microbiology and biochemistry.
4. Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S.R., & Hernandez, J.P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, *378*, 1-33. https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x
5. Bechtaoui, N., Raklami, A., Benidire, L., Tahiri, A.I., Göttfert, M., & Oufdou, K. (2020). Effects of PGPR co-inoculation on growth, phosphorus nutrition and phosphatase/phytase activities of faba bean under different phosphorus availability conditions. *Polish Journal of Environmental Studies*, *29*(2), 1557-1565. https://doi.org/10.15244/pjoes/110345
6. Chabot, R., Antoun, H., & Cescas, M.P. (1996). Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Plant and Soil*, *184*, 311-321. https://doi.org/10.1007/ BF00010460
7. Chapman, H.D., & Pratt, P.F. (1962). Methods of analysis for soils, plants and waters. *Soil Science*, *93*, 68. https://doi.org/10.1097/00010694-196201000-00015
8. Chauhan, A., Guleria, S., Balgir, P.P., Walia, A., Mahajan, R., Mehta, P., & Shirkot, C.K. (2017). Tricalcium phosphate solubilization and nitrogen fixation by newly isolated *Aneurini bacillus* aneurinilyticus CKMV1 from rhizosphere of *Valeriana jatamansi* and its growth promotional effect. *Brazilian Journal of Microbiology*, *48*, 294-304. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.12.001
9. Chouyia, F.E., Romano, I., Fechtali, T., Fagnano, M., Fiorentino, N., Visconti, D., & Pepe, O. (2020). P-solubilizing *Streptomyces roseocinereus* MS1B15 with multiple plant growth-promoting traits enhance barley development and regulate rhizosphere microbial population. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 1137. https://doi.

org/10.3389/fpls.2020.01137
10. Cozzolino, V., Monda, H., Savy, D., Di Meo, V., Vinci, G., & Smalla, K. (2021). Cooperation among phosphate solubilizing bacteria, humic acids and Arbuscular mycorrhizal fungi induces soil microbiome shifts and enhances plant nutrient uptake. *Journal of Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *8*(1), 1-18. https://doi.org/10.1186/s40538-021-00230-x
11. Da Costa, E.M., de Lima, W., Oliveira-Longatti, S.M., & de Souza, F.M. (2015). Phosphate-solubilising bacteria enhance *Oryza sativa* growth and nutrient accumulation in an oxisol fertilized with rock phosphate. *Ecological Engineering*, *83*, 380-385. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.06.045
12. Dehsheikh, A.B., Sourestani, M.M., Zolfaghari, M., & Enayatizamir, N. (2020). Changes in soil microbial activity, essential oil quantity, and quality of Thai basil as response to biofertilizers and humic acid. *Journal of Cleaner Production*, *256*, 120439. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120439
13. Divjot, K., Rana, K.L., Tanvir, K., Yadav, N., Yadav, A.N., & Kumar, M. (2021). Biodiversity, current developments and potential biotechnological applications of phosphorus-solubilizing and-mobilizing microbes: a review. *Pedosphere*, *31*, 43–75. https://doi.org/10.1016/S1002-0160(20)60057-1
14. Dong, Z., Liu, Y., Li, M., Ci, B., Lu, X., Feng, X., & Ma, F. (2023). Effect of different NPK fertilization timing sequences management on soil-petiole system nutrient uptake and fertilizer utilization efficiency of drip irrigation cotton. *Scientific Reports*, *13*, 14287. https://doi.org/10.1038/s41598-023-40620-9
15. Ekin, Z. (2019). Integrated use of humic acid and plant growth promoting rhizobacteria to ensure higher potato productivity in sustainable agriculture. *Journal of Sustainability*, *11*, 123-417. https://doi.org/10.3390/ su11123417
16. Esringü, A., Kaynar, D., Turan, M., & Ercisli, S. (2016). Ameliorative effect of humic acid and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on Hungarian vetch plants under salinity stress. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *47*, 602-618. https://doi.org/10.1080/00103624.2016.1141922
17. Farhat, M.B., Boukhris, I., & Chouayekh, H. (2015). Mineral phosphate solubilization by *Streptomyces* sp. CTM396 involves the excretion of gluconic acid and is stimulated by humic acids. *FEMS Microbiology Letters*, *362*, 5. https://doi.org/10.1093/femsle/fnv008
18. Ghorbani Nasrabadi, R., Greiner, R., Mayer-miebach, E., & Menezes-Blackburn, D. (2023). Phosphate solubilizing and phytate degrading *Streptomyces* isolates stimulate the growth and P accumulation of maize (*Zea mays*) fertilized with different phosphorus sources. *Geomicrobiology Journal*, *40*, 325-336. https://doi.org/10.1080/01490451.2023.2168799
19. Hedley, M.J., Stewart, J.W.B., & Chauhan, B. (1982). Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laaoratory incubations. *Soil Science Society of America Journal*, *46*, 970-976. https://doi.org/10.2136/sssaj1982.03615995004600050017x
20. Hoseini, S.S., Zalaghi, R., Enayatizamir, N., & Feizian, M. (2023). The effect of sewage sludge application on soil phosphatase activity and nutrients uptake by maize plant inoculated with symbiotic fungi. *Journal of Soil Management and Sustainable Production*, *13*(4), 45-62. (In Persian with English abstract)
21. Kalayu, G. (2019). Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 4917256. https://doi.org/10.1155/2019/4917256
22. Karami, Y., Samadi, A., fallah Nosratabad, A., Sepehr, E., & Barin, M. (2021). Quantitative evaluation of dissolved and microbial biomass phosphorus released from insoluble phosphates by some strains in order to select efficient bacteria. *Journal of Soil Management and Sustainable Production*, *11*(4), 55-75. (In Persian with English abstract).
23. Khalid, R., Khalid, A., Shabaan, M., Asghar, H.N., & Zahir, Z.A. (2023). Phosphorous (P)-solubilizing *Rhizobacteria* improve P availability to Mung bean via enhanced soil phosphatase activity and improve its growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *23*(4), 6155-6166. https://doi.org/10.1007/s42729-023-01473-3
24. khalili, N., Ghorbani Nasrabadi, R., Baranimotlagh, M., & Khodadadi, R. (2023). The effect of humic acid and inoculation of actinomycetes isolates on phosphorus solubilization in laboratory condition and phosphorus content in maize (*Zea mays*). *Journal of Soil Management and Sustainable Production*, *13*(2), 75-94. (In Persian with English abstract).
25. Khan, N., Siddiqui, M.H., Ahmad, S., Ahmad, M.M., & Siddiqui, S. (2024). New insights in enhancing the phosphorus use efficiency using phosphate-solubilizing microorganisms and their role in cropping system. *Geomicrobiology Journal*, 1-11. https://doi.org/10.1080/01490451.2024.2331111
26. Liu, F., Qian, J., Zhu, Y., Wang, P., Hu, J., Lu, B., & Li, F. (2024). Phosphate solubilizing microorganisms increase soil phosphorus availability: a review. *Geomicrobiology Journal*, *41*(1), 1-16. https://doi.org/10.1080/01490451.2023.2272620
27. Margalef, O., Sardans, J., FernandezMartínez, M., Molowny-Horas, R., Janssens, I.A., Ciais, P., Goll, D., Richter, A., Obersteiner, M., Asensio, D., & Penuelas, J. (2017). Global patterns of phosphatase activity in natural soils. *Scientific Reports*, *7*(1), 1-13. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01418-8
28. Mehta, S., & Nautiyal, C.S. (2001). An efficient method for qualitative screening of phosphate solubilizing

bacteria. *Journal of Current Microbiology*, *43*, 51-56. https://doi.org/10.1007/s002840010259
29. Nahidan, S., & Ghasmzadeh, M. (2022). Biochemical phosphorus transformations in a calcareous soil as affected by earthworm, cow manure and its biochar additions. *Applied Soil Ecology*, *170*, 104310. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104310
30. Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Rosa, R.C.C., & Canellas, L.P. (2015). Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Scientia Horticulturae*, *183*, 100-108. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.012
31. Olivares, F.L., Busato, J.G., de Paula, A.M., da Silva Lima, L., Aguiar, N.O., & Canellas, L.P. (2017). Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *4*, 1-13. https://doi.org/10.1186/s40538-017-0112-x
32. Olsen, S.R. (1954). Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. *US Department of Agriculture*.
33. Orsi, M. (2014). Molecular dynamics simulation of humic substances. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *1*, 1-14. https://doi.org/10.1186/s40538-014-0010-4
34. Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., & Kaushik, S. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering Biotechnology*, *15*(2), 379–391. https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.06.005
35. Pang, F., Li, Q., Solanki, M. K., Wang, Z., Xing, Y. X., & Dong, D. F. (2024). Soil phosphorus transformation and plant uptake driven by phosphate-solubilizing microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, *15*, 1383813. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1383813
36. Peng, Y., Duan, Y., Huo, W., Xu, M., Yang, X., Wang, X., & Feng, G. (2021). Soil microbial biomass phosphorus can serve as an index to reflect soil phosphorus fertility. *Biology and Fertility of Soils*, *57*, 657-669. https://doi.org/10.1007/s00374-021-01563-3
37. Pishchik, V.N., Vorobyov, N.I., Walsh, O.S., Surin, V.G., & Khomyakov, Y.V. (2016). Estimation of synergistic effect of humic fertilizer and *Bacillus subtilis* on lettuce plants by reflectance measurements. *Journal of Plant Nutrition*, *39*, 1074-1086. https://doi.org/10.1080/01904167.2015.1061551
38. Raiesi, T., & Hosseinpur, A. (2013). The Rhizospheric Effects of Wheat (*Triticum aestivum L.*) on Phosphorus Release Kinetics. *Water and Soil*, *27*(4), 780-791. (In Persian with English abstract)
39. Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, SC. (2021). Phosphate solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutritions*, *21*(1), 49–68. https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7
40. Rosa, P.A.L., Galindo, F.S., Oliveira, C.E.D.S., Jalal, A., Mortinho, E.S., Fernandes, G.C., Marega, E.M.R., Buzetti, S., & Teixeira Filho, M.C.M. (2022). Inoculation with plant growth-promoting bacteria to reduce phosphate fertilization requirement and enhance technological quality and yield of sugarcane. *Microorganisms*, *10*(1), 192. https://doi.org/10.3390/microorganisms10010192
41. Sadeghi, E., Ghorbani Nasrabadi, R., Movahedi Naeini, S.A.R., Baranimotlagh, M., Khoshhal Sarmast, M., & Pahlevan-Rad, M.R. (2023) Using compost and triple superphosphate fertilizer to promote soil microbial and enzymatic properties and maize (*Zea mays*) growth in loess soil. *Agricultural Engineering*, *46*(2), 121-139. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.1007/s42729-024-01940-5
42. Sarmah, R., & Sarma, A.K. (2023). Phosphate solubilizing microorganisms: A review. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *54*, 1306-1315. https://doi.org/10.1080/00103624.2022.2142238
43. Shah, F., & Wu, W. (2019). Soil and crop management strategies to ensure higher crop productivity within sustainable environments. *Sustainability*, *11*, 1485. https://doi.org/10.3390/su11051485
44. Shams El-Deen, R.O., El-Azeem, A., Samy, A.M., Abd Elwahab, A.F., & Mabrouk, S.S. (2020). Effects of phosphate solubilizing microorganisms on wheat yield and phosphatase activity. *Egyptian Journal of Microbiology*, *55* (The 14th Conference of Applied Microbiology), 71-86. https://doi.org/10.21608/ejm.2020.20675.1137
45. Sheikhloo, F., & Rasouli Sadaghiani, M. (2016). Effects of different agronomic and forest land uses on soil enzyme activity. *Iranian Journal of Soil and Water Research*, *47*(1), 205-216. (In Persian with English abstract).
46. Silva, L.I.D., Pereira, M.C., Carvalho, A.M.X.D., Buttrós, V.H., Pasqual, M., & Dória, J. (2023). Phosphorus-solubilizing microorganisms: a key to sustainable agriculture. *Agriculture*, *13*(2), 462. https://doi.org/10.3390/agriculture13020462
47. Smith, S. (1994). Effect of soil pH on availability to crops of metals in sewage sludge-treated soils. I. Nickel, copper and zinc uptake and toxicity to ryegrass. *Environmental Pollution*, *85*(3), 321-327. https://doi.org/10.1016/0269-7491(94)90054-X
48. Sparling, G.P., Feltham, C.W., Reynolds, J., West, A.W., & Singleton, P. (1990). Estimation of soil microbial C by a fumigation-extraction method: use on soils of high organic matter content, and a reassessment of the kEC-factor. *Soil Biology and Biochemistry*, *22*(3), 301-307. https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90104-8
49. Spohn, M., & Kuzyakov, Y. (2013). Phosphorus mineralization can be driven by microbial need for carbon. *Soil*

Biology and Biochemistry, *61*, 69-75. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.02.013

50. Tabatabai, M.A., & Bremner, J.M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, *1*, 301-307. https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1
51. Wahid, F., Sharif, M., Steinkellner, S., Khan, M.A., Marwat, K.B., & Khan, S.A. (2016). Inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing bacteria in the presence of rock phosphate improves phosphorus uptake and growth of maize. *Pakistan Journal of Botany*, *48*, 739-747.
52. Wu, W., Wang, F., Xia, A., Zhang, Z., Wang, Z., Wang, K., & Cui, X. (2022). Meta-analysis of the impacts of phosphorus addition on soil microbes. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *340*, 108180. https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108180
53. Yadav, H., Fatima, R., Sharma, A., & Mathur, S. (2017). Enhancement of applicability of rock phosphate in alkaline soils by organic compost. *Applied Soil Ecology*, *113*, 80-85. https://doi.org/10.1016/j.apsoil. 2017.02.004
54. Yang, J., Kloepper, J.W., & Ryu, C.M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, *14*, 1-4. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.004
55. Yuan, Y., Gai, S., Tang, C., Jin, Y., Cheng, K., Antonietti, M., & Yang, F. (2022). Artificial humic acid improves maize growth and soil phosphorus utilization efficiency. *Journal of Applied Soil Ecology*, *179*, 104-587. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104587
56. Zhang, J., Li, Y., Wang, J., Chen, W., Tian, D., & Niu, S. (2021). Different responses of soil respiration and its components to nitrogen and phosphorus addition in a subtropical secondary forest. *Forest Ecosystems*, *8*, 1-13. https://doi.org/10.1186/s40663-021-00313-z